

Embryologie cellulaire et moléculaire

M^{me} Nicole LE DOUARIN, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

Les cours de cette année ont été délivrés à Paris et à Toulouse.

Six heures de cours ont été délivrés à l'Université de Toulouse III :

- La neurulation chez les Amniotes
- La crête neurale : une structure clé de l'évolution des Vertébrés
- Les chimères embryonnaires, une méthode d'étude du développement du système sanguin et de la fonction immunitaire

Le cours de deux heures au Collège de France portait sur les cellules souches et a introduit le séminaire de la Chaire d'Embryologie cellulaire et moléculaire qui s'est tenu pendant un jour et demi (les 25 et 26 mai). Il portait sur le sujet suivant : « Cellules souches embryonnaires et adultes : *perspectives thérapeutiques* ».

Le programme du séminaire était le suivant :

- Nicole LE DOUARIN : « Introduction »
- Bertrand PAIN (*Vivalis, Hôtel-Dieu, Nantes*)
« Cellules souches embryonnaires aviaires : un outil pour la recherche. »
- Charles BABINET (*Institut Pasteur*)
« Les multiples facettes des cellules souches embryonnaires de souris. »
- John D. GEARHART (*Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore*)
« Cellules souches pluripotentes humaines : obtention et différenciation. »
- Jean-Paul RENARD, (*Unité de Biologie du Développement et Biotechnologies, INRA*)
« Clonage somatique et totipotence nucléaire chez les mammifères. »
- Ronald McKAY (*National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Bethesda*)
(Titre non communiqué)

- Angelo L. VESCOVI (*Institute for Stem Cell Research, DBIT, Milan*)
« Cellules souches neurales humaines et murines : plasticité et potentialités. »
- Arnold I. CAPLAN (*Skeletal Research Center, Cleveland*)
« Stratégies d'ingénierie tissulaire à partir des cellules souches mésenchymateuses de l'adulte. »
- Giulio COSSU (*Universita La Sapienza, Rome*)
« Progéniteurs mésodermiques pluripotents d'origine vasculaire embryonnaire. »
- Anne EICHMANN (*Institut d'Embryologie cellulaire et moléculaire, CNRS et Collège de France*)
« Le premier hémangioblaste de l'embryon. »
- Françoise DIETERLEN (*Institut d'Embryologie cellulaire et moléculaire, CNRS et Collège de France*)
« Les générations successives de cellules souches hématopoïétiques de l'embryon à l'adulte. »
- Bruno PEULT (*INSERM U506, Hôpital Paul Brousse, Villejuif*)
« Emergence des cellules souches hématopoïétiques chez l'embryon et le fœtus humain. »
- Pierre CESARO (*INSERM U421, Faculté de Médecine, Université Paris XII*)
« Perspectives thérapeutiques : essais cliniques et précliniques en progrès. »
- Nicole LE DOUARIN « Conclusions »

INVITATION DE PROFESSEURS SUR UNE CHAIRE D'ÉTAT

Le Professeur Heiner WESTPHAL, du National Institute of Child Health and Human Development de Bethesda (Maryland, USA), a donné une série de trois cours en juin sur les sujets suivants :

- Hirschsprung disease : mouse model of a multiplication disease
- How LIM homeodomain genes control organogenesis
- Dickkopf and sonic hedgehog, two amazing head sculptors.

Le Professeur David ANDERSON, de l'Institut Californien de Technologie de Pasadena (Californie, USA) donnera quatre cours en octobre sur les sujets suivants :

- Biology of stem cells and progenitor cells in the vertebrate peripheral nervous system
- Transcriptional control of autonomic neurogenesis
- Angiogenesis and the problem of blood vessel identity.

Le Prix de la Fondation Antoine Lacassagne a été décerné au Pr. Jules HOFFMANN, Directeur de l'Institut de Biologie moléculaire et cellulaire du CNRS à Strasbourg et a donné lieu à deux conférences :

— La réponse antimicrobienne de la drosophile : un modèle pour l'étude de l'immunité innée

— Les peptides antimicrobiens dans la défense immunitaire, des insectes à l'homme.

RÉSUMÉ DE L'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

Les recherches effectuées au cours de l'année académique 1999-2000 par le groupe que je dirige sont la continuation des travaux exposés l'année précédente (voir Annuaire du Collège de France 1998-1999).

Les thèmes de recherche abordés sont les suivants :

I. La crête neurale

II. Neurulation, neurogenèse et développement des organes axiaux

III. Rôle de la voie BMP dans la squelettogenèse

IV. Immunologie de la tolérance

V. Hématopoïèse

VI. Localisation chromosomique de divers gènes chez le poulet.

Par ailleurs, depuis le 1^{er} janvier 2000 plusieurs chercheurs ont formé des équipes postulantes dont la composition et l'activité sont présentées dans les chapitres VII à X. Les thèmes de recherche de ces équipes sont les suivants :

VII. Étude moléculaire et cellulaire de la formation des muscles du membre

VIII. Développement hématopoïétique

IX. Édification du système hématopoïétique de l'embryon de souris

X. Ontogenèse du système hématopoïétique.

I. LA CRÊTE NEURALE

Chercheur : Nicole Le Douarin

Ingénieur de Recherche : Élisabeth Dupin

ITA : Delphine Champeval, Corinne Glavieux

Caractérisation des endothélines et de leurs récepteurs dans la crête neurale et ses dérivés

L'influence de l'environnement sur le devenir des cellules de crête neurale (CN) chez l'embryon de vertébré a été reconnue à la suite de nombreux travaux *in vivo* et *in vitro* réalisés pour la plupart chez l'oiseau (pour références, Le Douarin, 1982 ; Le Douarin *et al.*, 1994 ; Le Douarin and Kalcheim, 1999).

Parmi les facteurs identifiés à ce jour, les endothélines apparaissent jouer un rôle crucial dans le développement de certains lignages dérivés de la CN. Ces peptides sécrétés par les cellules endothéliales ont été découverts pour leur action sur les muscles lisses de la paroi des vaisseaux (Yanagisawa *et al.*, 1988), mais interviennent également dans de nombreux autres processus physiologiques (Rubanyi and Polokoff, 1994).

Les endothélines sont donc essentielles au développement normal de la CN et sont impliquées dans certaines pathologies de ses dérivés. Toutefois, les mécanismes d'action et le rôle précis des endothélines dans le développement de la CN (migration, prolifération, différenciation et survie) étant inconnus, nous avons entrepris des recherches sur cette question dans le modèle aviaire, qui permet l'analyse de ces phénomènes tout au long de la vie embryonnaire et où la CN a été très étudiée.

Nous nous sommes intéressés cette année au rôle que peut jouer l'EDN3 à un stade tardif du développement du lignage mélanocytaire, lorsque les cellules ont migré dans la peau et se sont différenciées dans l'épiderme de l'embryon. Nous montrons que l'EDN3 est un mitogène puissant des cellules pigmentaires épidermiques dont elle est capable de modifier le programme de différenciation en induisant l'expression de marqueurs gliaux dans une partie de leur descendance. En effet, en cultures clonales, la moitié environ des cellules pigmentaires traitées *in vitro* par l'EDN3 revient à l'état de précurseurs bipotents glio-mélanocytaires, et pourrait ainsi constituer une réserve de cellules souches capables de répondre à une stimulation par l'EDN3 *in vivo* dans la peau (Dupin *et al.*, 2000).

La crête neurale antérieure est nécessaire à la viabilité du prosencéphale

Chercheurs : Heather Etchevers, Gérard Couly, Nicole Le Douarin

ITA : Louis Addade, Christine Vincent

Par la méthode des chimères caille/poulet, nous explorons les capacités du mésoderme céphalique à fournir des péricytes au prosencéphale. Nous savons maintenant qu'une greffe hétérotopique de mésoderme du niveau mésencéphalique, qui donne naissance aux péricytes et aux méninges du mésencéphale, peut en fournir également au prosencéphale et partiellement compenser la résection de la population la plus antérieure de la crête neurale. Ces travaux ont été publiés dans la revue Development en août 1999.

En cherchant la nature d'une activité trophique produite par la crête neurale mésencéphalique qui agirait sur la croissance du prosencéphale, nous nous sommes portés sur l'IGF2 (insulin-like growth factor 2). D'après des études très récemment publiées par une autre équipe, ce facteur de croissance serait exprimé précocement dans les méninges. Après avoir mis au point les conditions nécessaires pour l'immunocytochimie chez le poulet, et après avoir obtenu parallèlement une sonde ribonucléique contre l'ARNm de l'IGF2 de poulet, nous constatons

avec regret que ceci est exprimé bien trop tard dans les méninges pour être un facteur trophique pour le cerveau avant sa vascularisation. Nous nous tournons maintenant vers le système tie2-angiopoietin et une éventuelle implication de l'endothélium en tant qu'intermédiaire de cette activité trophique du mésenchyme.

Nous écrivons actuellement une étude anatomique détaillée du système artériel.

Chercheurs : Sophie Creuzet, Gérard Couly et Nicole Le Douarin

ITA : Louis Addade, Christine Vincent

Par des échanges interspécifiques entre la caille et le poulet, nous avons testé la compatibilité entre l'expression du code Hox par les cellules dérivées de la crête et la différenciation chondrogénique dans la région nasale. Le devenir des cellules de crête, transposées à partir de domaines Hox négatif ou Hox positif au niveau diencéphalique, a été confronté au maintien de leurs identités moléculaires respectives et à l'apparition des structures ostéo-cartilagineuses.

La transposition unilatérale de crête mésencéphalique, appartenant au domaine *Hox* négatif, au niveau diencéphalique, n'entraîne aucun déficit morphologique ou histologique chez les embryons greffés. Ainsi, les cellules de caille participent à différents dérivés tissulaires conformément à leur site de greffe, et sont capables de se différencier en cellules gliales, conjonctives, et péricytes. De plus, elles se différencient en cartilage tant au niveau de la sclérotique que du septum nasal.

La transposition de la crête rhombencéphalique s'étendant de r4 à r6, dont les dérivés expriment normalement le gène *Hoxa 2*, conduit à la différenciation des cellules de la crête en cellules gliales, conjonctives et péricytes, mais celles-ci ne prennent pas part aux structures ostéo-cartilagineuses. Ainsi, le développement morphologique des embryons greffés qui se déroule normalement, est assuré par la compensation des crêtes contralatérales de l'hôte. Les cellules de caille se condensent en agrégats cellulaires dispersés en périphérie de la sclérotique et dans la région nasale, au voisinage des placodes olfactives. En regard de ces dernières, la détection du transcrit *Hoxa-2* montre que les cellules de caille conservent leur identité moléculaire d'origine.

Afin d'éviter la compensation des structures ostéo-cartilagineuses par les crêtes endogènes, nous avons procédé à la résection bilatérale des crêtes de l'hôte (appartenant au domaine Hox positif et s'étendant de r2 jusqu'au niveau diencéphalique). L'implantation de crêtes rhombencéphaliques conduit les cellules de caille à ne former que des amas cellulaires dispersés, ce qui démontre l'incapacité des cellules *Hox* positives à organiser des structures cartilagineuses différenciées. À leur niveau quelques figures d'apoptose, suggèrent qu'elles font l'objet d'une dégénérescence. L'examen des embryons greffés révèle des déficits morphologiques majeurs qui consistent en l'absence de bec supérieur, de bourgeon nasal, associée à un déficit de septum. Le maintien de l'expression du gène *Hoxa-2*

semble alors associé à des processus de mort cellulaire dans les structures formées par les cellules de caille (Creuzet *et al.*, en préparation).

II. NEURULATION, NEUROGENÈSE ET DÉVELOPPEMENT DES ORGANES AXIAUX

Chercheurs : Marie-Aimée Teillet, DR2 CNRS, Jean-Baptiste Charrier (*Interne des Hôpitaux de Paris, 2^e année de Thèse*), Chloé Bertolus (*Interne des Hôpitaux de Paris, en disponibilité pour 1 an, DEA*)

ITA : Françoise Lapointe, Bernadette Schuler, Marie-France Hallais

Collaborations : Delphine Duprez, CR2 CNRS, Institut d'Embryologie, Nogent-sur-Marne, Danielle Dhouailly, Pr. Université de Grenoble, UMR 5538 CNRS, Institut A. Bonniot.

Organogenèse précoce du tube nerveux

Des expériences de marquage cellulaire utilisant le système des chimères caille-poulet nous ont permis de montrer que toutes les cellules de la ligne médiane (CLM), plancher du tube nerveux ou *floor plate* (FP), notochorde et endoderme dorsal, ont une origine commune dans le nœud de Hensen, une structure transitoire située à l'extrémité rostrale de la ligne primitive (Catala *et al.*, 1996). Au cours de la gastrulation, le nœud de Hensen effectue un mouvement de recul permettant aux CLM de s'insérer, après délamination, au sein des trois feuilletts existant plus caudalement.

L'unité d'origine de toutes les cellules de la FP et de la notochorde que nous avons démontrée expérimentalement mettait en cause la théorie généralement admise selon laquelle la notochorde est l'inducteur de la FP. Cette théorie est basée sur des expériences de greffe et d'ablation de notochorde *in vivo* et sur des cultures *in vitro*. Ces dernières attribuaient à la protéine SHH un rôle essentiel dans l'induction de la FP (Tanabe & Jessell, 1996 pour références). En combinant le marquage cellulaire des cellules de la ligne médiane et l'ablation de la notochorde nous avons démontré qu'en fait la FP est déterminée dès sa mise en place et que l'absence de FP observée dans certaines expériences d'ablation de notochorde est due à une ablation concomitante d'un segment de FP ou d'une partie du nœud de Hensen (Teillet *et al.*, 1998a).

L'analyse moléculaire du nœud de Hensen au stade de 5-6 somites a révélé que cette structure est hétérogène (Charrier *et al.*, 1999). Nous distinguons 3 zones dans le nœud : une zone rostrale (a) où la notochorde et la FP sont des structures séparées contenant des transcrits de *HNF3 β* et de *Shh* ; une zone moyenne (b) où la future FP et la future notochorde se distinguent par leur organisation cellulaire mais ne sont pas séparées par une membrane basale. *HNF3 β* est fortement exprimé dans les deux structures mais *Shh* est faiblement exprimé dans cette zone ; une zone caudale (c) très limitée, sans organisation

particulière et exprimant uniquement *HNF3 β* . L'ablation sélective de la zone c empêche définitivement le recul du nœud, de sorte que le tube nerveux qui se forme plus caudalement est dépourvu de cellules de la ligne médiane. En l'absence des cellules de la ligne médiane tous les tissus de cette région de l'embryon subissent dans les 24 heures une apoptose qui conduit à la troncation de l'embryon (Charrier *et al.*, 1999).

SHH est indispensable à la survie des somites

Nous avons montré récemment, à l'aide d'ablations et greffes, que le facteur nécessaire à la survie du dermomyotome et du sclérotome provient de la partie ventrale du tube nerveux (FP) et de la notochorde. Il s'agit de la protéine SHH (Teillet *et al.*, 1998b). Dans une autre étude en collaboration avec Isabel Olivera-Martinez et Danielle Dhouailly (Grenoble) nous avons montré que SHH n'est pas suffisant pour une bonne différenciation du derme et des plumes, aussi d'origine somitique. Un facteur issu de l'ectoderme est indispensable à l'organogénèse plumaire (Olivera-Martinez *et al.*, soumis à Development).

III. ROLE DE LA VOIE BMP DANS LA SQUELETTOGENÈSE

Chercheur : Anne-Hélène Monsoro-Burq, Nicolas Holleville (étudiant en thèse)

ITA : Martine Bontoux

Collaboration : Muriel Umbhauer, Univ. Paris VI

Formation de la vertèbre

Nous avons abordé la question de la formation de l'apophyse épineuse et montré que son mode de développement diffère largement de celui qui contrôle la formation du reste de la vertèbre.

Ainsi, deux cascades moléculaires antagonistes interviennent successivement : à 2 jours de développement (E2), le facteur SHH, produit par la notochorde et la plaque du plancher du tube neural permet la survie du somite, la formation du sclérotome et la différenciation du cartilage profond ; à E3, la protéine BMP4, produite par la plaque du toit du tube neural, induit l'expression des gènes *Msx1* et *2* dans le mésenchyme à destinée squelettique qui migre dorsalement sous l'ectoderme et permet la différenciation du cartilage superficiel (Monsoro-Burq et Le Douarin, 1999, 2000a).

Clonage, expression et étude fonctionnelle de *Smad1*

La crête neurale constitue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes contrôlant l'émergence de types cellulaires variés à partir d'une population-mère.

La crête neurale est une structure transitoire de l'embryon des Vertébrés qui se forme à partir de la partie dorsale du tube neural, moelle épinière ou cerveau. En plus des dérivés tels que les neurones, la glie, des cellules endocrines ou les mélanocytes, la crête neurale céphalique génère le més ectoderme, ensemble des précurseurs du derme, du conjonctif et du squelette facial et cranien.

Dans ce projet, nous nous intéressons au rôle des « Bone Morphogenetic Proteins » ou BMPs dans l'établissement de cette diversité, plus particulièrement dans le contrôle de la détermination du més ectoderme et de sa différenciation osseuse en position sous-cutanée. Ces problèmes sont de grande importance tant sur le plan fondamental que médical en raison de l'existence de nombreuses malformations craniofaciales et dérèglements de l'ossification chez l'Homme qui pourraient être dus à des perturbations des cascades moléculaires contrôlées par les BMPs.

Nos travaux précédents ont mis en évidence le rôle de BMP4 dans la détermination et la différenciation d'une sous-population de précurseurs de la vertèbre qui se développent en position sous-cutanée. BMP4 contrôle l'expression des gènes *Msx1* et *Msx2* dans cette population, qui échappe alors à l'influence du facteur ventralisant Sonic Hedgehog (Monsoro-Burq et Le Douarin, 2000a).

En ce qui concerne la crête neurale céphalique, on sait actuellement que dans le rhombencéphale, BMP4 contrôle un équilibre délicat entre émergence et mort des cellules au départ de leur migration, et que la mutation des gènes *Msx1* et *Msx2* résulte en de graves anomalies osseuses du crâne et de la face (craniosynostoses).

Nous tirons parti des avantages de l'embryon d'oiseau pour la manipulation expérimentale *in vivo* et de l'acquis exceptionnel du laboratoire en matière de culture *in vitro* de crête neurale aviaire pour déterminer le rôle des BMPs dans la détermination, la migration et la différenciation de la crête neurale céphalique. Nous venons de montrer tout d'abord l'existence d'une sous-population de cellules, dont la destinée est de former le crâne et la face, qui répond aux signaux BMPs et exprime le gène *Msx1* très tôt au cours de son développement (résultats non publiés). Pour pouvoir manipuler expérimentalement la voie de signalisation des BMPs dans ce système, j'ai ensuite isolé et cloné un gène-clé de la transduction du signal des BMPs, *Smad1* (Monsoro-Burq et Le Douarin, 2000b), puis réalisé des constructions activées ou dominantes-négatives de ce gène et vérifié leur activité dans le système de l'embryon de Xénope, en collaboration avec Dr M. Umbhauer (Paris 6). Ces constructions sont donc capables d'activer ou de bloquer la cascade contrôlée par les BMPs via *Smad1*, dans les cellules dans lesquelles on les introduit.

Tout d'abord, nous analyserons l'effet de ces constructions sur le développement de la crête neurale céphalique par électroporation *in ovo* : faute de pouvoir réaliser des oiseaux transgéniques, l'expression ectopique de gènes était jusqu'ici réalisée grâce à l'emploi de vecteurs rétroviraux. Cette technique présentait l'in-

convénient de nécessiter environ 24 heures avant que le transgène ne commence à être transcrit, ce qui rend cette méthode impropre à l'étude des phénomènes précoces du développement, comme la formation de la crête neurale. Nous pouvons depuis peu réaliser l'expression transitoire de vecteurs plasmidiques *in ovo* grâce à la technique d'électroporation développée par Nakamura et coll. Nous avons adapté cette technique au laboratoire et obtenu l'expression du gène rapporteur dès 6 heures après l'opération. Cette technique économique et rapide permet de réaliser une « transgénèse » localisée, permettant de bloquer localement l'activité de gènes dont la mutation chez la souris provoque une mortalité précoce, comme c'est le cas pour BMP4. L'utilisation combinée de Smad1 et de la protéine fluorescente GFP permettra un suivi *in ovo* des cellules transfectées au cours de leur migration dans l'embryon, avant l'analyse de leur différenciation.

En parallèle, nous avons étudié la régulation de l'expression de Smad1 dans le mésoderme de l'embryon, au cours de la gastrulation (publication en préparation) et au cours de la polarisation droite- gauche de l'embryon (Monsoro-Burq et Le Douarin, 2000b). Nous avons aussi comparé l'expression de Smad1 avec celle des gènes BMP2, BMP4, BMP7 et leurs récepteurs BMP R IA et IB. Nos résultats montrent une étroite corrélation entre les différents patrons d'expression et la régulation de Smad1 dans le mésoderme par les BMPs elles-mêmes.

— **Monsoro-Burq A.-H.** and Le Douarin N.M. (1999) Aspects moléculaires de la chondrogenèse vertébrale. *J. Soc. Biol* 193 (1) 263-268

— **Monsoro-Burq A.-H.** and Le Douarin N.M. (2000a) Duality of molecular signaling involved in vertebral chondrogenesis, in *Somitogenesis*, Current Topics in Developmental Biology, Vol 47, C. Ordhal ed, Academic Press.

— **Monsoro-Burq A.-H.** and Le Douarin N.M. (2000b) Left right asymmetry in BMP4 signalling pathway during chick gastrulation. *Mech Dev.* (sous presse)

— **Monsoro-Burq, A.-H.** Bontoux M., Le Douarin N. M. (2000, en préparation) « Developmental regulation of Smad1 gene during mesoderm formation in avian embryos ».

IV. IMMUNOLOGIE DE LA TOLÉRANCE

Chercheurs : Nicole Le Douarin, J. Salaün (DR2)

Ingénieur de Recherche : Pierre Vaigot

ITA : Patricia Belo-Diabangouaya, Samia Haddad

Collaborations extérieures : A. Bandeira, R. Araujo, (Institut Pasteur, Paris), A. Coutinho (Instituto Gulbenkian de Ciencia, Portugal)

Étude des mécanismes impliqués dans l'établissement de la tolérance

Nous poursuivons l'étude de la tolérance vis-à-vis du soi, en particulier dans le cadre de la création du Laboratoire Européen Associé entre le CNRS, l'Institut

Pasteur, l'Université Pierre et Marie Curie et la Fondation Calouste Gulbenkian à Lisbonne. Nous étudions les interactions cellulaires et la dynamique des mécanismes de suppression, ainsi que les propriétés fonctionnelles des cellules régulatrices. Nos résultats suggèrent en effet l'intervention dans l'induction de la tolérance au soi, de mécanismes de tolérance dominante où sont impliquées des cellules régulatrices sélectionnées par l'épithélium thymique et qui pourraient jouer un rôle important en particulier vis-à-vis des antigènes non présents dans le thymus.

Récemment nous avons mis en évidence l'implication de cellules T régulatrices dans l'établissement du diabète chez la souris NOD (non obèse diabétique). En effet nous avons étudié le devenir d'îlots pancréatiques allogéniques placés dans des thymus de fœtus NOD eux-mêmes greffés dans le mésentère de souris NOD de 1 à 3 mois, le propre thymus du receveur n'étant pas injecté. Nous constatons une importante diminution de la fréquence d'apparition du diabète chez les animaux ainsi opérés, par rapport à la fréquence observée chez la souris NOD non opérée ou greffée avec un thymus sans aucun îlot pancréatique.

Ainsi les lymphocytes se différenciant au sein du greffon thymique au contact des îlots pancréatiques sont tolérants aux îlots et sont capables de supprimer la réactivité des autres cellules T, amenant une réduction des infiltrations lymphocytaires dans le pancréas de l'hôte (article en préparation).

Étude de la dynamique des cellules T dérivées des précurseurs hématopoïétiques précoces et de l'homéostasie lymphocytaire

Chez la souris, la colonisation de l'ébauche thymique par les précurseurs hématopoïétiques commence au 11^e jour de la gestation. La greffe de thymus prélevés sur des fœtus au 14^e jour de la gestation, à des souris nude, permet d'étudier les potentialités d'expansion de cette population particulière de cellules T, dans des conditions syngéniques et allogéniques.

Nous avons greffé des thymus d'embryon de 14 et 17 jours et de nouveau-nés de la souche C57BL/6B.A., dont les lymphocytes T expriment le marqueur Thy1.1, à des souris nude des souches BALB/c et C57BL/6. L'émigration à la périphérie et la persistance des cellules du donneur sont suivies par le marquage des lymphocytes Thy1.1 et Thy1.2, à différents temps après la greffe.

Nous avons observé que les cellules T issues du donneur émigrent hors du thymus et sont remplacées par les cellules de l'hôte en moins de 4 semaines après la greffe du thymus. Pour étudier les potentialités d'expansion des cellules issues des lymphocytes fœtaux en absence des cellules de type adulte, nous avons prélevé le thymus greffé avant le 21^e jour après la greffe du thymus afin de permettre la restauration de la souris nude par les lymphocytes issus du donneur et de limiter le nombre de cellules issues du receveur. Nous avons constaté que le pourcentage des cellules du donneur se maintient dans le cas où

les cellules Thy1.1 représentent plus de 94 % des lymphocytes T sanguins au moment de la thymectomie, mais que dans les cas où cette population est inférieure à 80 % le pourcentage diminue rapidement.

Ces résultats mettent en évidence les capacités d'expansion des cellules de type fœtal et montrent également que cette expansion ne peut se faire qu'en absence des cellules de type adulte. De plus, la greffe de nombreux lobes thymiques fœtaux ou de nouveau-nés, nous permet d'étudier l'homéostasie des lymphocytes à la périphérie dans des conditions syngéniques et allogéniques.

(Article en préparation)

V. HÉMATOPOÏÈSE

Marqueurs des progéniteurs hématopoïétiques aviaires et évaluation de leurs potentialités

Chercheur : Catherine Corbel

Ingénieur de Recherche : Pierre Vaigot

ITA : Anne Lehmann

L'intégrine GPIIb-IIIa est exprimée par les progéniteurs hématopoïétiques de différents lignages chez l'Oiseau

La molécule GPIIb-IIIa, récepteur du fibrinogène, est exprimée par les cellules du lignage mégacaryocytaire des mammifères. Il existait cependant une controverse en ce qui concerne son expression par les progéniteurs hématopoïétiques d'autres lignages : myéloïdes et érythroïdes. Nous avons entrepris l'étude de l'expression de la glycoprotéine GPIIb-IIIa dans le modèle aviaire pour déterminer, d'une part si la présence de GPIIb-IIIa est restreinte ou non au lignage mégacaryocytaire, d'autre part si cette molécule identifie également les progéniteurs lymphocytaires et enfin connaître son patron d'expression au cours de l'embryogenèse.

Un anticorps monoclonal (Mab) 11C3, spécifique des thrombocytes (équivalent aviaire des plaquettes sanguines) et de leurs précurseurs immédiats, les thromboplastes, produit par P. Quéré a été utilisé pour cette étude. La distribution cellulaire de l'antigène reconnu par le Mab 11C3, l'analyse biochimique et l'étude fonctionnelle ont montré que cet anticorps identifie l'homologue aviaire de l'intégrine plaquettaire GPIIb-IIIa, (CD41/CD61 ou α Ib β 3).

Grâce au modèle aviaire qui permet de disséquer des stades embryonnaires très précoces, nous pouvons déterminer à quel moment et où dans l'embryon apparaissent les premières cellules GPIIb-IIIa⁺. Ainsi, nous montrons que des cellules positives sont localisées sur les faces ventrolatérales de l'endothélium, sous forme de bourgeonnements intraaortiques, chez des embryons de poulet à

3,5-4 jours d'incubation (E3.5-4). Ce sont les premières et les seules cellules intraembryonnaires à exprimer cette molécule. À E6-8, les foyers intraembryonnaires présents dans le mésenchyme paraaortique contiennent des cellules GPIIb-IIIa positives. Nos données obtenues sur coupes ainsi que notre système de tri cellulaire et de culture *in vitro* permettent de tester les potentialités des cellules de cette région aortique ventrale. Nous montrons que des progéniteurs monocytaires, érythroïdes, thrombocytaires et granulocytaires sont présents dans la population GPIIb-IIIa⁺ CD45⁺ de cette région intraembryonnaire à E3.5-4.

Des progéniteurs myéloïdes (CFU-M, -G, -GM) et érythroïdes (BFU-E) sont également détectés et enrichis dans la population cellulaire GPIIb-IIIa⁺ c-kit⁺ de moelle embryonnaire (E14) et adulte. Grâce à des injections intrathymiques de cellules c-kit⁺ GPIIb-IIIa⁺ dans les poussins irradiés, nous avons montré que des progéniteurs lymphocytaires T sont également présents dans cette population.

En conclusion, nous avons montré que l'intégrine GPIIb-IIIa, un marqueur présumé spécifique des cellules d'un lignage particulier, le lignage mégacaryocytaire, est aussi exprimé par d'autres cellules progénitrices, les progéniteurs des lignages myéloïdes et érythroïdes, mais aussi les progéniteurs des lymphocytes T. La molécule GPIIb-IIIa est un outil très utile pour la mise en évidence des sites intraembryonnaires d'hématopoïèse et pour isoler les progéniteurs hématopoïétiques embryonnaires et adultes.

Expression de l'antigène de classe II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) par les progéniteurs des lymphocytes T et des cellules myéloïdes aviaires

Dans la moelle osseuse embryonnaire, les progéniteurs des cellules T sont présents dans la population de cellules qui expriment c-kit. Nous avons recherché si ces progéniteurs hématopoïétiques expriment les molécules de classe II du CMH. Des expériences *in vivo* de transfert cellulaire intrathymique ont été réalisées pour identifier les progéniteurs T dans les populations c-kit⁺CMH Classe II⁺ et c-kit⁺CMH Classe II⁻. Les progéniteurs T sont restreints aux cellules c-kit⁺CMH Classe II⁺, avec une fréquence de 1 progéniteur pour 4 cellules doublement positives. Cependant, des expériences *in vitro* en cultures clonales montrent que les progéniteurs myéloïdes qui se différencient en monocytes, macrophages et granulocytes sont présents dans les 2 populations, exprimant ou non les molécules de Classe II du CMH. Les progéniteurs érythroïdes ne sont présents que dans la population cellulaire c-kit⁺CMH Classe II⁻. Par ailleurs, les cellules de la population double positive sont fortement marquées par le colorant supravital rhodamine 123 (rho 123), témoignant d'une forte activité mitotique, critère reconnu pour les progéniteurs hématopoïétiques primitifs (non engagés dans un lignage donné).

Bien que d'autres marqueurs doivent être utilisés pour préciser le phénotype des progéniteurs T, ces résultats montrent que les cellules qui expriment conjointement c-kit et un domaine non polymorphe de la chaîne β du CMH de Classe II sont des progéniteurs unipotents, restreints au lignage T, et/ou mixtes, lignages T et myéloïde.

Expression de CD44 au cours du développement chez le Poulet

CD44 récepteur de l'hyaluronate, est une glycoprotéine membranaire. Chez les mammifères, elle existe sous différentes formes moléculaires. La plus commune est l'isoforme ayant un poids moléculaire d'environ 90 000. C'est une molécule d'adhérence qui présente une distribution tissulaire très large, puisque elle est exprimée par des cellules ayant une origine mésodermique et neuroectodermique. Le CD44 a été beaucoup étudié car son expression est augmentée dans de nombreux cas de tumeurs malignes et par conséquent cette molécule joue un rôle important dans la régulation du développement de tumeurs *in vivo*. Récemment, T.F. Davison et ses collègues ont cloné le gène du CD44 aviaire et produit un anticorps spécifique, AV6 à l'aide duquel j'ai entrepris l'étude ontogénique de la distribution de CD44.

La spécificité du marquage immunocytochimique d'embryon *in toto* au cours de l'ontogénèse indique que cette molécule est exprimée de façon transitoire par des cellules des crêtes neurales céphaliques aux stades étudiés (de 7 à 14 somites). CD44 commence à être exprimé par les cellules du repli neural céphalique puis par des sous-populations de cellules de la crête neurale en pré-migration et en émigration. Les cellules de la crête neurale troncale n'expriment par CD44.

Au stade 18-20 somites, les cellules CD44 positives sont aussi localisées dans la région caudale de l'embryon : dans le mésoderme de la ligne primitive et dans l'ectoderme caudal et au-dessus du tube neural secondaire pendant le processus de cavitation. Une telle spécificité d'expression paraît être d'un grand intérêt pour étudier les mécanismes de migration des cellules des crêtes neurales. En effet, pendant leur migration, les cellules des crêtes neurales établissent des contacts avec la matrice extracellulaire via des molécules d'adhérence, l'une d'entre elles serait CD44.

Aspects moléculaires de la Mise en place de l'hématopoïèse chez l'homme

Chercheur : Marie-Claude Labastie

ITA : Cécile Debacker

À l'image de ce qui a été démontré dans les autres espèces de vertébrés, un territoire hématogène intraembryonnaire précoce a été également caractérisé dans l'embryon humain, sous forme d'amas denses de cellules rondes, CD34⁺, au

contact de l'endothélium ventral de l'aorte et de l'artère omphalo-mésentérique, entre la quatrième et la sixième semaine de gestation. L'analyse phénotypique a révélé qu'ils sont constitués de cellules non endothéliales (Ulex europaeus⁻), hématopoïétiques (CD45⁺), précurseurs (CD34⁺, CD31⁺, CD38⁻, Lin⁻). Ces cellules expriment les messagers codant les facteurs de transcription Tal-1/SCL, c-myb, et GATA-2 ainsi que ceux des récepteurs à activité tyrosine kinase c-kit et KDR/VEGFR-2, dont le rôle dans l'émergence du système hématopoïétique a été démontré. D'autre part, en conditions équivalentes de culture *in vitro*, ces progéniteurs CD 34⁺ aortiques présentent un potentiel de prolifération très supérieur à celui des cellules CD 34⁺ de moelle osseuse adulte.

Nous avons cherché à isoler des molécules qui seraient spécifiquement ou particulièrement abondamment exprimées par cette population primitive de cellules souches hématopoïétiques et pourraient rendre compte de leur intense activité de prolifération. Nous avons construit une banque ADNc 3' à partir des progéniteurs CD34⁺ isolés de l'aorte d'un embryon humain de 5 semaines de gestation et effectué un criblage différentiel de cette banque avec une sonde ADNc 3' préparée à partir de cellules CD34⁺CD38⁻ isolées du foie embryonnaire d'un embryon de 6,5 semaines de gestation. Nous avons ainsi isolé la région 3' homologue du messager codant la protéine SNRK de rat, une nouvelle sérine thréonine kinase dont le rôle n'est pas déterminé. Le clonage des messagers complets codant les protéines SNRK humaine et de souris et l'étude de leur patron d'expression dans l'embryon et les cellules hématopoïétiques montrent : 1) qu'il est spécifique des premières cellules endothéliales et sanguines qui émergent dans le mésoderme ; 2) qu'il est dépendant de signaux transduits par le récepteur de l'érythropoïétine ; 3) qu'il est présent dans les lignées leucémiques indépendantes de facteurs de croissance mais qu'il ne l'est pas dans les lignées qui en dépendent ; 4) qu'il est massivement induit dans les territoires apoptotiques. Ces observations suggèrent l'implication de SNRK dans les phénomènes de différenciation, prolifération et mort cellulaire.

VI. LOCALISATION CHROMOSOMIQUE DE DIVERS GÈNES DANS LE GÉNOME DU POULET

Chercheur : Kafia Ladjali-Mohammedi (post-doc)

Collaborations intérieures et extérieures : C. Ayer Le Lièvre (DR2), M. Leibovici (CR2), V. Nataf (post-doc), L. Lecoin (post-doc), A. Grapin-Botton (post-doc), A. Eichmann (CR1), C. Corbel (DR2, M. Tixier-Boichard (INRA de Jouy-en-Josas), D. Gourichon (INRA, Nouzilly), P. Voisin (UMR 6558 du CNRS, Poitiers), P. Remy (UPR 9005 du CNRS, Strasbourg) MMDCD, Institut de physiologie et Chimie Biologique, Strasbourg, Pr. J. J. Bitgood, (University of Wisconsin-Madison), Pr. F. A. Ponce De Leon Department of Veterinary and animals Sciences, university of Minnesota.

Le poulet est un modèle de choix pour l'étude des génomes aviaires car c'est chez cette espèce que l'identification des chromosomes est la plus avancée. Le caryotype du poulet (*Gallus domesticus*) est constitué de 38 paires de chromosomes autosomes et des chromosomes sexuels Z et W. La femelle représente le sexe hétérogamétique. Une nomenclature standard internationale a été établie pour les 8 premières paires chromosomiques et les chromosomes sexuels (Ladjali *et al.*, sous presse). Les premières paires de microchromosomes ont été identifiées jusqu'à la 15^e paire grâce à la technique de double synchronisation par de la thymidine (Ladjali *et al.*, 1995). Les microchromosomes dont les tailles varient entre 7 et 23 M bases représentent le quart du génome de poulet.

La cartographie de séquences codant pour des gènes connus est intéressante à plusieurs égards. En effet, il est indispensable de connaître la position d'un gène biologiquement important, dont les mutations pourraient entraîner l'apparition de pathologies ou de malformations. Nous disposons dans notre Institut de gènes de poulet appartenant à plusieurs super familles : Les gènes Hox, les gènes récepteurs aux odorants, les gènes récepteurs de l'endothéline (A, B et B2) et les gènes de récepteurs tyrosine kinase (RTK).

K. Ladjali-Mohammedi, J. J. Bitgood, M. Tixier-Boichard and F. A. Ponce de Leon. International System for Standardized Avian Karyotypes (ISSAK) : Standardized Banded Karyotypes of the Domestic Fowl (*Gallus Domesticus*). Cytogenet Cell Genet. 86 : 271-276 (1999).

Les gènes à homéobox

De nombreux gènes à homéobox clonés chez le poulet sont étudiés au Laboratoire d'embryologie cellulaire et moléculaire par l'équipe de N. Le Douarin. Par contre, il n'existait pas de travaux réalisés sur les chromosomes des oiseaux susceptibles de fournir des informations sur la distribution de ces gènes dans le génome.

L'existence de liens physiques entre ces gènes, déjà démontrée sur les chromosomes des mammifères, est un élément précieux pour la compréhension de l'évolution de ces gènes chez les oiseaux. **K. Ladjali-Mohammedi**, A. Grapin-Botton, M.A. Bonnin and N. Le Douarin. Distribution of Hox genes in the chicken genome reveals a new segment conservation between human and chicken. Cytogenet Cell Genet (sous presse).

Les gènes des récepteurs aux odorants

La détection chromosomique des gènes des récepteurs aux odeurs a été effectuée essentiellement chez l'homme (Schurmans *et al.*, 1993 ; Lancet and Ben-Arie., 1993). Certains des récepteurs aux odeurs ont été localisés sur le bras long du chromosome 3 et sur le bras court du chromosome 17. Dans ce dernier cas

la cartographie de 16 gènes a été effectuée (Lancet and Ben-Arie., 1993). Toutefois, ils ne représentent qu'une partie du répertoire, ce qui indique que d'autres chromosomes porteraient aussi certains de ces gènes. Chez la souris le gène de récepteurs aux odeurs numéro 17 est porté par le chromosome 7 où il serait lié physiquement à des récepteurs d'autres sous-familles (Chess *et al.*, 1994). Chez le poulet, nous disposons actuellement de 4 gènes de récepteurs aux odeurs complètement séquencés représentant 3 sous-familles (COR2, COR3 et COR4), soit au moins 11 gènes distincts. Nous avons essayé de savoir dans quelle mesure ces gènes et leurs liaisons physiques avaient pu être conservés dans d'autres espèces aviaires. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'existence de gènes orthologues chez la caille et le canard.

Nos résultats récents de localisation des récepteurs aux odeurs sur les chromosomes du poulet montrent que ces gènes sont distribués sur plusieurs chromosomes (7 régions chromosomiques différentes). La liaison physique déjà établie par Leibovici *et al.*, (1996) pour les gènes COR2 et COR4 a ainsi pu être confirmée puisque plusieurs membres de ces deux sous familles ont été localisés sur les mêmes régions chromosomiques. Une publication de ce travail est en cours de préparation. (Ladjali-Mohammedi *et al.*,)

A. M. Mager, A. Grappin-Botton, **K. Ladjali**, D. Meyer, C. M. Wolff, P. Stiegler, M. A. Bonnin and P. Remy. (1998). The avian *fli* gene is specifically expressed during embryogenesis in a subset of neural crest cells giving rise to mesenchyme. *Int. J. Dev. Biol.* 42 : 561-572.

A. Grechez-Gassiau, M. Bernard, **K. Ladjali**, I. R. Rodriguez and P. Voisin. (1998) Structural analysis of the chicken hydroxyindole-O-methyltransferase gene. *Eur. J. Biochem.* 258, 44-52.

Les récepteurs de l'endothéline

Nous avons localisé les récepteurs de l'endothéline A sur le bras long du chromosome 4 du poulet et le récepteur B2 sur le bras court. L'homologue humain du récepteur A a été localisé sur le chromosome 4. Il n'existe pas pour l'instant de récepteur B2 chez l'homme. Toutefois, le chromosome 4 humain présente de nombreuses régions de conservation avec le chromosome 4 du poulet, ce qui nous laisserait penser que l'homologue du récepteur B2 (s'il existe ?), serait sur le même chromosome.

Il reste actuellement à préciser la localisation du récepteur de l'endothéline B.

Nous cherchons à déterminer si ces gènes sont localisés sur des régions chromosomiques correspondant aux différentes mutations affectant la pigmentation chez les oiseaux.

Une publication de ce travail est en cours de préparation pour être soumise à *Cytogenet. Cell. Genet.*

VII. ÉTUDE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE DE LA FORMATION DES MUSCLES DU MEMBRE

Chercheurs : Delphine Duprez, Marie-Claire Delfini (étudiante en thèse)

ITA : Marie-Ange Bonnin

Étude des fonctions respectives des facteurs myogéniques MYOD et MYF-5

Ce travail a été commencé par Marie-Claire Delfini pendant son DEA (DEA de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Développement, Paris VI VII et XI ; année 1998/1999) et est poursuivi durant sa thèse (financement bourse MRT).

La cascade d'apparition des facteurs myogéniques au cours du développement chez la souris au niveau axial et périphérique est bien établie, Myf5 est exprimé avant MyoD. La chronologie d'apparition des facteurs myogéniques de poulet a toujours été considérée comme inversée par rapport à la souris aussi bien au niveau axial qu'au niveau périphérique. Contrairement à ce dogme, nos résultats d'expression endogène montrent que les transcripts Myf5 sont détectés avant ceux de MyoD dans le bourgeon de membre de poulet. Le domaine d'expression de MyoD est inclus dans celui de Myf5. Ces résultats indiquent que le gène Myf5 agirait en amont de MyoD au cours de la myogenèse dans le membre chez le poulet.

La voie de signalisation de Notch/Delta est connue pour intervenir dans le maintien des cellules dans un état indifférencié et ce dans de nombreux systèmes et espèces. Chez les mammifères la seule indication de l'implication de Notch dans la myogenèse provient d'études sur des lignées cellulaires où l'activation de Notch supprime la différenciation musculaire ; par contre il n'existe pas de preuve expérimentale *in vivo*. Nous avons entrepris d'activer la voie de signalisation Notch *in vivo* en surexprimant le ligand Delta. La construction Delta/RCAS a déjà donné un phénotype dans la rétine de l'embryon de poulet. Le récepteur Notch1 est exprimé uniformément dans le bourgeon d'aile, alors que les ligands Delta1 et Serrate2 sont localisés dans les masses musculaires. Des greffes de cellules produisant le virus Delta/RCAS conduisent à activer ectopiquement l'expression du récepteur Notch1, 24 et 48 heures après la greffe ; ce qui reflète l'activation de la voie de signalisation Notch. Ce type de greffe conduit à inhiber l'expression de MyoD dans l'aile infectée alors que les domaines d'expression de Myf5 et de Pax3 ne sont pas affectés. La perte d'expression de MyoD est accompagnée d'une absence de protéine myosine. Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation Notch interviendrait entre l'étape Myf5 et l'étape MyoD, lors de la myogenèse.

Ces résultats sont en cours de rédaction et feront l'objet d'une publication : Delfini M.C., Hirsinger E., Pourquie O. and Duprez D. (2000) Involvement of Notch signalling in the transition from the Myf5 step to the MoD step during myogenesis in the chick limb bud.

Étude de la participation des Fgfs dans la myogenèse

Ce travail a été pris en charge par Frédérique Edom dans le cadre d'un stage post-doctoral. Les Fgfs constituent une famille d'au moins 18 membres qui médient de nombreuses réponses biologiques par l'intermédiaire de quatre récepteurs à tyrosines kinases (Martin, 1998). L'addition des Fgfs en culture conduit à l'inhibition de la différenciation musculaire (Olson, 1992 ; Molkenin et Olson, 1996), mais leurs rôles dans les différentes étapes du développement musculaire dans un contexte *in vivo* ne sont pas encore compris.

Nous avons montré que l'ARNm *Fgf-4* est localisé aux extrémités des myotubes. J'ai inséré la séquence codante de *Fgf4* de souris (mFgf4) dans le rétrovirus compétent pour la réplication RCASBP(A). La construction recombinante mFgf4/RCAS a été transfectée dans des cellules qui ont ensuite été greffées au niveau du bourgeon d'aile. L'utilisation du *Fgf4* murin nous permet de visualiser la présence de mFgf4 ectopique. L'expression ectopique de mFgf4, dans le bourgeon de membre, inhibe la différenciation musculaire périphérique et conduit à la disparition de tous les marqueurs musculaires, que l'on a pu tester, incluant *Pax3*, *Myf5* et *MyoD*. De même, aucune réactivité n'est observée avec l'anticorps MF20, reconnaissant la myosine embryonnaire dans les régions infectées, alors que la myosine est normalement détectée dans les ailes contrôles provenant du même embryon.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication en négociation avec Development : Edom-Vovard F., Bonnin M.A. and Duprez D. Overexpression of Fgf4 in the chick limb inhibits myogenesis by reducing muscle cell number. (2000)

VIII. DÉVELOPPEMENT HÉMANGIOPOIÉTIQUE

Chercheurs : Anne Eichmann, Luc Pardanaud, Li Yuan, Delphine Moyon

ITA : Christiane Bréant, Marie-Claude Birot

Nous avons cloné les équivalents aviaires des VEGFR2 et VEGFR3 de mammifères (Eichmann *et al.*, 1993, MOD, 42 : 33-48 ; Eichmann *et al.*, 1996, Gene, 174 : 3-8). Des études d'hybridation *in situ* ont montré une expression sélective des VEGFR2 et 3 dans les vaisseaux sanguins chez l'embryon de poulet et de caille. Cependant, l'expression du VEGFR2 précède l'apparition des transcrits VEGFR3 et s'observe dès que la gastrulation est initiée (Eichmann *et al.*, 1993, MOD, 42 : 33-48).

Un travail d'embryologie expérimentale avait suggéré que les cellules VEGFR2⁺ étaient des angioblastes (Couly *et al.*, 1995, MOD, 53 : 97-112). Les cellules VEGFR2⁺ correspondent à la cartographie qu'avait effectuée Murray (Murray, 1932, Proc. Roy. Soc. Biol. 497-521) pour l'hémangioblaste, hypothétique précurseur commun aux cellules endothéliales et aux cellules hématopoïétiques. Le VEGFR2 était le premier marqueur moléculaire disponible pour démontrer l'existence de cette cellule.

Clonage d'un membre de la famille des pim serine-threonine kinases chez la caille et analyse d'expression

Nous avons cloné, chez la caille, un nouveau cDNA, *qpim*, montrant une forte homologie avec la famille des Pim serine-threonine kinases.

Qpim montre le plus d'homologie avec *pim-3* de rat. Nous avons comparé les patrons d'expression de *qpim* chez la caille avec l'expression des gènes *pim-1*, *2 et 3* chez la souris. Il s'avère que aucun des trois gènes *pim* chez la souris montre un patron d'expression correspondant à celui de *qpim*. Il est donc possible que ce gène représente un quatrième membre de cette famille. Les gènes *pim-1*, *2 et 3* chez la souris ont des patrons d'expression complexe et partiellement recouvrant durant le développement embryonnaire. L'absence d'un gène *pim* pourrait donc être compensée par un autre membre de cette famille. Cependant, les gènes *pim* ont des sites d'expression importants en dehors du compartiment hématopoïétique, notamment dans le système nerveux. (Eichmann *et al.*, 2000, Oncogene 19 : 1215-1224).

Étude de l'origine du système vasculaire par construction de chimères caille-poulet

Dans le cadre de la restructuration du laboratoire, Luc Pardanaud du groupe de Françoise Dieterlen a choisi de rejoindre mon groupe.

Luc Pardanaud a notamment montré qu'il existe deux sources d'angioblastes chez l'embryon, le somite et le mésoderme splanchnopleural. Le somite fournit des cellules endothéliales vascularisant la région dorsale de l'embryon, alors que le mésoderme splanchnopleural, qui se développe en contact avec l'endoderme, est une source de précurseurs vascularisant les viscères. Ces précurseurs sont en plus capables de fournir les cellules souches hématopoïétiques intraembryonnaires de l'aorte ventrale (Pardanaud *et al.*, 1996, Development, 122 : 1363-1371). La distribution des précurseurs des différentes sources obéit donc à une régionalisation stricte et mutuellement exclusive. Les contrôles cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation des potentialités angiopoïétique/hémangiopoïétique sont soumis à deux gradients, un négatif, dorsal, provenant de l'ectoderme, et un positif, ventral, médié par l'endoderme. Plusieurs facteurs de croissance, dont le VEGF, sont de bons candidats pour assurer le maintien de ce gradient (Pardanaud & Dieterlen-Lièvre, 1999, Development, 126 : 617-627).

Luc Pardanaud a récemment montré que des cellules endothéliales circulantes étaient présentes chez l'embryon. Dans une première approche il a vérifié que des angioblastes ou des cellules endothéliales injectées dans la circulation conservaient leurs propriétés de différenciation. Des suspensions de mésoderme splanchnopleural ou de somites de caille ont été injectées dans le cœur d'embryons de poulet à E2. Après 24 h, les angioblastes et les cellules endothéliales de caille participent au réseau vasculaire de l'hôte, notamment au niveau de la

tête et du sac vitellin. Dans une deuxième approche, les injections intracardiaques dans le poulet ont été réalisées avec des suspensions de cellules non rouges isolées à partir de sang d'embryons de caille de différents âges. Une journée après l'injection, les premiers résultats, réalisés avec du sang de 3, 4 et 5 jours, montrent que des cellules endothéliales QH1⁺ participent à l'arbre vasculaire de l'hôte.

Luc Pardanaud recherche actuellement si ces précurseurs circulants sont présents tout au long de la vie embryonnaire et s'ils participent à des processus de réendothélialisation consécutifs à une blessure.

IX. ÉDIFICATION DU SYSTÈME HÉMATOPOÏÉTIQUE DE L'EMBRYON DE SOURIS

Chercheurs : Isabelle Godin, Manuella Tavian (post-doc)

ITA : Michèle Klaine

Au cours de l'année 1999-2000 nous avons publié les résultats déjà acquis et entrepris de développer de nouvelles approches :

I — L'analyse *in vitro* des propriétés des précurseurs hématopoïétiques intra-embryonnaires, en collaboration avec A. Cumano, à l'Institut Pasteur (Godin *et al.*, 1999, *J. Exp. Med.* 190 : 1-10) montrant que : **1**-la Sp-PA/AGM produit des précurseurs, mais ne constitue pas un site d'hématopoïèse, puisqu'il ne s'y produit pas de différenciation active, **2**-Les précurseurs intra-embryonnaires pourraient donc constituer une population homogène de précurseurs très immatures estimée à environ 500 cellules, **3**-La génération de CSH et leur diversification s'opèrent dans des sites distincts. Les deux processus semblent s'exclure mutuellement, **4**-les précurseurs intra-embryonnaires sont concentrés dans l'aorte et le mésentère qui lui est sous-jacent.

Nous tentons à l'heure actuelle d'obtenir une descendance lymphoïde à partir de SV explantés avant la mise en circulation des précurseurs intra-embryonnaires. D'autre part, nous voulons déterminer si les précurseurs intra-embryonnaires qui se forment dans la Sp avant l'établissement de la circulation, possèdent la capacité de renouvellement à long terme, afin de comprendre quel sont les facteurs qui interdisent l'implantation chez l'adulte des premiers précurseurs multipotents de l'embryon.

II — L'analyse combinatoire de l'expression de facteurs de transcription impliqués dans les étapes précoces de la différenciation hématopoïétique effectuée au cours de sa thèse par A. Manaia (Manaia *et al.*, 2000, *Development*, 127 : 643-653). Nos résultats montrent pour la première fois que GATA-3 (un facteur de transcription exclusivement impliqué dans l'hématopoïèse définitive) est exprimé dans l'environnement dans lequel les précurseurs se développent. M. Tavian, qui a rejoint notre groupe pour un stage post-doctoral, analyse le développement de l'hématopoïèse chez des embryons présentant une inactivation du gène GATA-3.

III — En collaboration avec F. Alliot et B. Pessac (Alliot *et al.*, 1999, *Dev. Brain Research*, 117 : 145-152), nous avons daté l'apparition des progéniteurs microgliaux dans différents sites de l'embryon, suivi l'évolution de leur nombre, et analysé l'origine embryonnaire de la microglie. Le SV apparaît être la source des progéniteurs microgliaux.

IV — La région qui sous-tend l'aorte ventrale exprime GATA-3 pendant toute la phase de génération des précurseurs hématopoïétiques intra-embryonnaires, mais également AA4.1, un antigène qui pourrait avoir une fonction dans la génération, la libération ou la migration des précurseurs hématopoïétiques. De plus, les bourgeonnements de précurseurs intra-embryonnaires au niveau aortique expriment AA4.1. (Petrenko *et al.*, 1999, *Immunity*, 10 : 691-700). Nous poursuivons la cartographie génique et protéique de cette région en vue d'une analyse en microscopie confocale : Nous voulons caractériser de façon plus précise les types cellulaires présents dans la région de l'AGM (environnement nécessaire à la génération, CSH natives) pour pouvoir les isoler spécifiquement en vue de leur immortalisation ou de la recherche de gènes qui leur sont spécifiques. Nous allons également définir la combinaison d'anticorps qui devra être utilisée pour purifier les cellules hématopoïétiques les plus immatures. Puis, nous analyserons *in vitro* la capacité des sous-populations triées à produire une progénie hématopoïétique.

X. ONTOGENÈSE DU SYSTÈME HÉMATOPOÏÉTIQUE

Chercheurs : Thierry Jaffredo, Arianna Caprioli, Cécile Drevon

ITA : Rodolphe Gautier, Marie-France Hallais

Collaborations extérieures : Ralph Dornburg (Thomas Jefferson University, Philadelphia), Giulio Cossu (University of Roma, Rome), Antony Green (University of Cambridge, GB), Dominique Dunon (Université P. et M. Curie, Paris)

L'analyse de l'émergence des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) au cours du développement embryonnaire repose aujourd'hui sur les faits suivants : 1) les CSH forment un « pool » de cellules qui sont mises à part au cours du développement ; 2) le sac vitellin, ou son équivalent chez les amphibiens l'îlot ventral, est le seul organe qui produit ses propres progéniteurs ; 3) à l'exception du sac vitellin, les CSH ont une origine extrinsèque aux organes hématopoïétiques définitifs qu'elles colonisent de façon secondaire ; 4) la réserve (supposée) permanente de CSH pour la vie de l'individu est dans la moelle osseuse ; 5) le sac vitellin, tout d'abord considéré comme central dans l'émergence des CSH, est maintenant reconnu comme un site produisant des progéniteurs dont l'activité est transitoire alors que les CSH naissent ailleurs. Aujourd'hui, un « ailleurs » est identifié : c'est la région de l'aorte embryonnaire ; des données expérimentales ont établi qu'elle était un site d'émergence hématopoïétique chez l'oiseau, la souris et les amphibiens.

Les Cellules Hématopoïétiques (CH) du plancher de l'aorte sont insérées parmi les cellules endothéliales (CE), ce qui suggère, comme au niveau du sac vitellin, l'existence d'une relation de développement entre ces deux types cellulaires. À partir de E6, un processus d'hématopoïèse diffuse se développe dans le mésentère dorsal : il s'agit des « foyers para-aortiques ». Ceux-ci sont présents à une période qui correspond au début de la colonisation de la rate, du thymus et de la bourse de Fabricius. En revanche le début de la colonisation de la moelle osseuse est tardif par rapport à la présence des foyers para-aortiques et nous avons émis depuis longtemps l'hypothèse qu'un site central, autre que l'aorte, pourrait être responsable de la production des CSH qui colonisent la moelle osseuse. Nous pensons avoir trouvé un site candidat : l'allantoïde.

Les cellules produites dans le plancher de l'aorte (E3) correspondent fonctionnellement aux premières CSH intra-embryonnaires. Bien que l'émergence de ces cellules *de novo* soit bien démontrée, les modalités en étaient encore floues :

— Ces cellules proviennent-elles directement du mésoderme ou bien sont-elles issues de l'endothélium aortique ?

— Quelles sont les relations entre ces bourgeonnements intra-aortiques présents à E3 et les foyers para-aortiques présents à E6-E9 ?

— Enfin quels sont le ou les sites de production de CSH intra-embryonnaires responsables de la colonisation de la moelle osseuse ?

Nous nous sommes attachés à répondre à ces questions et avons apporté certains éléments de réponse.

— *Les cellules du plancher de l'aorte sont des hémangioblastes ou, en d'autres termes le plancher de l'aorte constitue un endothélium hémogénique (Jaffredo et al., 1998) ;*

— *Il y a, chez l'oiseau, une relation ontogénique directe entre les cellules des bourgeonnements intra-aortiques et celles des foyers para-aortiques (Jaffredo et al., soumis) ;*

— *Le bourgeon allantoïdien de caille greffé chez le poulet émet des cellules endothéliales et hématopoïétiques qui colonisent la moelle osseuse (Caprioli et al., 1998).*

Enfin nous développons, ou améliorons, des outils rétroviraux utiles pour suivre des lignages cellulaires ou immortaliser des cellules. Les résultats les plus significatifs sont décrits ci-dessous.

— *Le virus SNV est un bon support de vecteur rétroviral, mais était supposé infecter les cellules humaines. Nous avons démontré que le tropisme du virus SNV pour les cellules humaines était dû à une contamination accidentelle des cellules de la lignée d'encapsulation (D17.2G) par un virus amphotrope. Ces résultats ont été soumis à la commission nationale des OGM qui a décidé de*

reclasser le virus SNV dans des groupes de confinement inférieurs (Gautier et al., 2000).

— Nous avons mis au point des vecteurs rétroviraux multifonctionnels contenant à la fois des propriétés de résistance à un antibiotique et de gène rapporteur en même temps qu'un gène d'intérêt. Le gène de résistance à la phléomycine (sh ble) est un petit gène (375 paires de bases) qui se fusionne facilement avec d'autres sans altérer les propriétés des protéines produites.

— Nous avons développé de nouveaux gènes de fusion entre sh ble et le gène de l'alcool déshydrogénase de *Drosophile* qui constituent les plus petites unités génétiques possédant des propriétés de résistance et de détection publiées à ce jour (Gautier et al., 1996).

— L'un des problèmes rencontrés dans la technologie des vecteurs rétroviraux est l'instabilité des lignées d'encapsulation qui produisent les vecteurs. J'ai développé un nouveau système basé sur l'interférence rétrovirale dans lequel les cellules qui expriment des niveaux faibles de protéines virales sont éliminées par des vecteurs rétroviraux portant des gènes suicide. Cette méthode novatrice devrait être d'intérêt général pour les travaux qui font appel aux vecteurs rétroviraux (R. Gautier et T. Jaffredo, en préparation).

LISTE DES PUBLICATIONS

1999

CHARRIER, J.-B. and TEILLET, M.-A. (1999). Recul du nœud de Hensen et croissance axiale de l'embryon. *J. Soc. Biol.*, 193, 237-241.

CHARRIER, J.-B., TEILLET, M.-A., LAPOINTE, F., and LE DOUARIN, N.M. (1999). Defining subregions of Hensen's node essential for caudalward movement, midline development and cell survival. *Development*, 126, 4771-4783.

CORTÉS, F., DEBACKER, C., PÉAULT, B. and LABASTIE M.C. (1999). Differential expression of KDR/VEGFR-2 and CD34 during mesoderm development of the early human embryo. *Mech. Dev.*, 83, 161-164.

DEBACKER, C., CATALA, M. and LABASTIE, M.-C. (1999). Embryonic expression of the human GATA-3 gene. *Mech. Dev.*, 85, 183-187.

DUPREZ, D., LEYNS, L., BONNIN, M.A., LAPOINTE, F., ETCHEVERS, H., DE ROBERTIS, E. and LE DOUARIN, N. (1999). Expression of Frzb-1 during chick development. *Mech. Dev.*, 89, 179-183.

DUPREZ, D., LAPOINTE, F., EDMOND-VOVARD, F., KOSTAKOPOULOU, K. and ROBSON, L. (1999). Sonic Hedgehog (SHH) specifies muscle pattern at tissue and cellular level, in the chick limb bud. *Mech. Dev.*, 82, 151-163. (erratum in *Mech. Dev.* 85, 217)

EICHMANN, A. and CORBEL, C. (1999). Les précurseurs des cellules endothéliales chez l'embryon d'Oiseau. *Path. Biol.*, 47, 307-313.

EICHMANN, A., CORBEL, C. and LE DOUARIN, N.M. (1999). Segregation of the embryonic vascular and hemopoietic systems. *Biochem. Cell Biol.* 76, 939-946.

EICHMANN, A., MOYON, D. and CORBEL, C. (1999). Récepteurs et développement des cellules endothéliales et hématopoïétiques. *J. Soc. Biol.*, 193, 155-157.

ETCHEVERS, H.C., COULY, G., VINCENT, C. and LE DOUARIN, N.M. (1999). Anterior cephalic neural crest is required for forebrain viability. *Development*, 126, 3533-3543.

GRAPIN-BOTTON, A., CAMBRONERO, F., WEINER, H.L., BONNIN, M.-A., PUELLES, L. and LE DOUARIN, N.M. (1999). Patterning signals acting in the spinal cord override the organizing activity of the isthmus. *Mech. Dev.*, 84, 41-53.

LADJALI-MOHAMMEDI, K., BITGOOD, J.J., TIXIER-BOICHARD, M. and PONCE DE LEON, F.A. (1999). International System for Standardized Avian Karyotypes (ISSAK) : standardized banded karyotypes of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Cytogenet. Cell. Genet.*, 86, 271-276.

LE DOUARIN, N.M. (1999). Embryologie Cellulaire et Moléculaire. Annuaire du Collège de France 1998-1999. Résumé des Cours et Travaux. 99^e année. Paris, pp. 325-346.

LE DOUARIN, N.M. and KALCHEIM, C. (1999). *The Neural Crest*, second edition. Cambridge University Press, New York, 445 pp.

LE DOUARIN, N.M., DIETERLEN-LIÈVRE, F., TEILLET, M.-A. and ZILLER, C. (1999). Interspecific chimeras in avian embryos. Developmental biology protocols, Vol. 1. In « *Methods in Molecular Biology* » R.S. Tuan and C.W. Lo eds. Humana Press Inc. Totowa, NJ, Vol. 135, pp. 373-386.

MONSORO-BURQ, A.-H. and LE DOUARIN, N.M. (1999). Aspects moléculaires de la chondrogenèse vertébrale. *J. Soc. Biol.*, 193, 263-268.

PALMEIRIM, I. (1999). La segmentation chez les Vertébrés : une horloge moléculaire liée à la segmentation périodique des somites. *J. Soc. Biol.*, 193, 243-256.

TEILLET, M.-A., ZILLER, C. and LE DOUARIN, N.M. (1999). Quail-chick chimeras. In *Molecular Embryology : Methods and Protocols*. Series : Methods in Molecular Biology, P.T. Sharpe and I. Mason eds., Humana Press, Totowa, N.J. USA, vol. 97, pp. 305-318.

TIROUVANZIAM, R. (1999). La mucoviscidose une maladie complexe et un paradigme pour la recherche biomédicale. *J. Soc. Biol.*, 193, 189-209.

2000

BURNS, A.J., CHAMPEVAL, D. and LE DOUARIN, N.M. (2000). Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut *in vivo* but fail to compensate for lack of enteric ganglia. *Dev. Biol.*, 219, 30-43.

CATALA, M., ZILLER, C., LAPOINTE, F. and LE DOUARIN, N.M. (2000). The developmental potentials of the caudalmost part of the neural crest are restricted to melanocytes and glia. *Mech. Dev.*, 95, 77-97.

CORBEL, C., LEHMANN, A., and DAVISON, F. Expression of CD44 during early development of the chick embryo. *Mech. Dev.* 96, 111-114.

CORTÉS, F. and LABASTIE, M.C. (2000). Contrôle moléculaire du développement du système hématopoïétique chez les vertébrés. *Méd. Sci.*, 16, 198-204.

CUMANO, A., DIETERLEN-LIÈVRE, F. and GODIN, I. (2000). The splanchnopleura/AGM region is the prime site for the generation of multipotent hemopoietic precursors, in the mouse embryo. *Vaccine*, 18, 1621-1623.

CUMINGE, D., SMITH, J. and DUBOIS, R. The effects of dexamethasone on the differentiation and the fertilisation of the germinal primordium in the chick embryo. *Reprod. Nutr. Dev.*, 40, 127-148.

DUPIN, E., GLAVIEUX, C., VAIGOT, P. and LE DOUARIN, N.M. Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. A reviewer pour *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 7882-7887.

EICHMANN, A., YUAN, L., BREANT, C., ALITALO, K. and KOSKINEN, P.J. (2000). Developmental expression of Pim kinases suggests functions also outside of the hematopoietic system. *Oncogene*, 19, 1215-1224.

GAUTIER, R., JIANG, A., ROUSSEAU, V., DORNBURG, R. and JAFFREDO, T. (2000). Avian reticuloendotheliosis virus strain A and spleen necrosis virus do not infect human cells. *J. Virol.*, 74, 518-522.

LE DOUARIN, N.M. and HALPERN, M. (2000). Origin and specification of the neural tube floor plate : insights from the chick and zebrafish. *Curr. Op. Neurobiol.*, 10, 23-30.

MANAIA, A., LEMARCHANDEL, V., KLAINE, M., MAX-AUDIT, I., ROMEO, P.-H., DIETERLEN-LIÈVRE, F. and GODIN, I. (2000). Lmo2 and GATA-3 associated expression in intraembryonic hemogenic sites. *Development*, 127, 643-653.

MONSORO-BURQ, A.-H. and LE DOUARIN, N.M. (2000). Duality of molecular signaling involved in vertebral chondrogenesis. In *Somitogenesis, Part 2*, Charles Ordahl Ed., *Curr. Top. Dev. Biol.*, 48, 43-75.

NATAF, V. and LE DOUARIN, N.M. (2000). Induction of melanogenesis by tetradecanoylphorbol-13 acetate and endothelin 3 in embryonic peripheral nerve cultures. *Pigment Cell Res.* 13, 172-178.

Sous presse

ALITALO, K., GUNJI, Y., ALITALO, R. and EICHMANN, A. VEGF receptors in vascular development and hematopoiesis. In : « *Hematopoiesis : A developmental approach* », Ed. L. Zon. Oxford University Press (sous presse).

BURNS, A.J. and LE DOUARIN, N.M. Enteric nervous system development : analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *Anat. Rec.*, (sous presse).

DUPIN, E., LECOIN, L. and LE DOUARIN, N.M. From multipotent neural crest precursors to differentiated cells : the role of endothelin signalling pathway. In *Regulatory Processes in Development : The Legacy of Sven Hörstadius*, Wenner-Gren International Symposium (August 23-25, 1998), Portland Press eds. (sous presse).

EICHMANN, A. and DIETERLEN-LIÈVRE, F. Ontogeny of the vascular system. In : *Comprehensive vascular biology : A encyclopedic reference*. Ed. A. Bikfalvi., Springer Verlag (sous presse).

EICHMANN, A., CORBEL, C., PARDANAUD, L., BRÉANT, C., MOYON, D. and YUAN, L. Hemangioblastic procsursors in the avian embryo. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (sous presse).

ODY, C., ALAIS, S., CORBEL, C., MCNAGUY, K.M., DAVISON, T.F., VAINIO, O., IMHOF, B., and DUNON, D. Surfaces molecules involved in avian T-cell progenitor migration and differentiation. *Dev. Immunol.* (sous presse).

Soumis

THOMAS-VASLIN, V., COLTEY, M., LE DOUARIN, N., SALAÜN, J. and SARON, M.-F. Thymic selection : in vivo evidence for positive selection and self-restriction of CD8 T cells on both hemopoietic and epithelial thymic cells.

LADJALI-MOHAMMEDI, K., GRAPIN-BOTTON, A., BONNIN, M.-A. and LE DOUARIN, N.M. Distribution of *Hox* genes in th chicken genome reveals a new segment conservation between human and chicken.

ODY, C., CORBEL, C., DUNON, D., VAINIO, O. and IMHOF, B.A. MHC class II and c-kit expression segregate T and myeloid progenitors from resting primitive hemopoietic stem cells.

DISTINCTIONS ET ACTIVITÉS DIVERSES

Nicole LE DOUARIN

Prix et Distinctions

2000 Grande Médaille d'Or de la Société d'Encouragement au Progrès
Grand Prix de la Fondation pour la Recherche Médicale

2000 Membre de la Pontifica Academia Scientiarum, Rome V.
Docteur Honoris Causa de l'Université Libre de Bruxelles
Élection en tant que Secrétaire Perpétuel de l'Académie des Sciences

Conférences honorifiques

1999 Keynote Lecture, First European Meeting on Zebrafisch Genetics & Development, Tübingen, Allemagne

Viktor Hamburger Lecture, University of Missouri in Saint-Louis, États-Unis

2000 Dean's Lecture Series at Mount Sinai School Medicin in New York City

Congrès

15^e Congrès International d'Anatomie, Rome, Italie du 11 au 16 septembre 1999.

12th IIGB Meeting : workshop on « Vasculogenesis and Angiogenesis », Capri, Italie, du 9 au 12 octobre 1999.

« H. Dudley Wright Science Colloquium », Göttingen, Allemagne, du 17 au 19 novembre 1999.

« Mécanismes moléculaires du développement précoce du système nerveux », Société de Biologie, Paris, le 16 février 2000.

Dean's Lecture Series at Mount Sinai School Medicine, New York city, New York, le 28 mars 2000.

Colloque International « Sciences du Vivant éthique et société », Université de Bordeaux 1, Bordeaux, les 22-23 juin 2000.

Séminaires

Séminaire Hôpital Bichat ; Invitation de Pierre Fresquel, le 28 janvier 2000.

Activités d'enseignement

Cours dans le cadre du DEA « Biologie moléculaire et cellulaire du développement » à l'Université Paris VI, le 30 octobre 1998.

Chaire UNESCO « Biologie du Développement » à l'Université Fédérale de Rio de Janeiro, Brésil, du 3 au 13 novembre 1998.

Chaire UNESCO « Biologie du Développement et Évolution » à l'Université Fédérale de Rio de Janeiro, Brésil, du 22 novembre au 5 décembre 1999.

Six cours à l'Université de Toulouse III, les 2 et 3 mai 2000.

Deux cours au Collège de France, Paris le 23 mai 2000.

Symposium « Cellules souches embryonnaires et adultes : *perspectives thérapeutiques* » dans le cadre de l'enseignement de la chaire d'Embryologie cellulaire et moléculaire du Collège de France, les 25 et 26 mai 2000.

Organisation de colloques, congrès et symposium

Fondation des Treilles, Tourtour, Var, du 15 au 18 juin 2000, « Molecular analysis of brain developmental function ».

Colloque de la Fondation des Treilles (Centre d'Études du Bassin Méditerranéen), organisé par N.M. Le Douarin et P. Gruss, du 15 au 18 juin 2000.

ACTIVITÉS DIVERSES
du personnel Collège de France affecté à l'Institut d'Embryologie

Anne-Hélène MONSORO-BURQ, Maître de Conférence

Responsabilité et encadrement de thèses et de stages postdoctoraux :

Alexandra Quilhac (janvier 1998-) « Analyse des gènes BMP4, Msx1 et 2, ostéocalcine et ostéopontine, au cours de la formation des sutures crâniennes ».

Nicolas Holleville (octobre 1999-) « Analyse de la voie de signalisation BMP-Smad1 in ovo ».

Encadrement de stage de maîtrise :

Anne-Cécile Moreau, avril-juin 1999 : « Analyse de l'expression de Noggin dans la crête neurale, initiation à la biologie moléculaire ».

Information scientifique (colloques français)

Journées de la Société de Biologie, 17 mars 1999 : Séminaire : « Aspects moléculaires de la chondrogenèse vertébrale ». Compte-rendu : J. Soc. Biol. 1999 193 : 263-268.

Hommage à l'œuvre scientifique de Nicole Le Douarin, octobre 1999, exposé.

Conférences internationales (invité)

Conférence de la Fondation des TREILLES, novembre 1999.

Colloques internationaux (communications affichées)

Colloque SFBD, Mur-de-Bretagne, 18-21 mai 1999.

Congrès EDBC 1999, Oslo, 19-23 juin 1999.

IMP Spring conference mai 2000 Vienne, Communication affichée.

Activités d'enseignement

DEA de Neurobiologie Sensorielle (Montpellier), décembre 1999 : « La polarité dorso-ventrale de la moelle épinière, rôles de Sonic Hedgehog et de BMP4 ».

CHU Paul Brousse, Le Kremlin-Bicêtre, décembre 1999 : « Aspects moléculaires de la différenciation au cours de l'embryogenèse ».

Maîtrise de sciences biologiques et médicales, Hôpital Cochin, janvier 2000 « Activation des gènes de la morphogenèse et de l'organogenèse ».

Maîtrise de sciences biologiques et médicales, Hôpital Pitié-Salpêtrière, février 2000 « Somitogenèse ».

Kafia LADJALI-MOHAMMEDI, Préparateur temporaire au Collège de France

Activités d'enseignement

1998-99 : 10 heures de cours de maîtrise de Biologie du Développement du Système Nerveux Central, Université de Limoges.

Encadrement de Stages

Encadrement d'une stagiaire en BTS de l'école des techniques de Biologie Appliquée. Juin-Août 1998.